

リンゴ

農薬名	添加量 ($\mu\text{g/g}$)	平均 ($\mu\text{g/g}$)	回収率 (%)	併行精度 (%)	室内精度 (%)	併行精度 目標値 (%)	室内精度 目標値 (%)
エチオン	0.1	0.08746	87.5	3.1	4.5	15	20
	0.02	0.01821	91.1	3.6	4.2	15	20
エトリムホス	0.1	0.08776	87.8	1.3	3.5	15	20
	0.02	0.01872	93.6	2.9	2.9	15	20
クロルピリホス	0.1	0.08814	88.1	3.3	3.4	15	20
	0.02	0.01923	96.2	2.6	2.6	15	20
クロルピリホスメチル	0.1	0.09671	96.7	1.9	3.8	15	20
	0.02	0.02085	104.3	3.3	3.7	15	20
ダイアジノン	0.1	0.08583	85.8	1.9	4.3	15	20
	0.02	0.01807	90.3	2.8	2.9	15	20
パラチオン	0.1	0.08711	87.1	2.4	4.1	15	20
	0.02	0.01793	89.7	3.0	3.1	15	20
パラチオンメチル	0.1	0.10036	100.4	1.3	9.2	15	20
	0.02	0.02118	105.9	3.0	5.9	15	20
フェニトロチオン	0.1	0.09936	99.4	1.3	6.9	15	20
	0.02	0.02101	105.0	3.5	5.3	15	20
フェンチオン	0.1	0.09297	93.0	1.8	3.3	15	20
	0.02	0.01945	97.3	3.3	5.9	15	20
プロチオホス	0.1	0.08569	85.7	4.3	5.0	15	20
	0.02	0.01841	92.1	3.8	3.8	15	20

Table 6 作物の差を含めた室内精度

	0.1 µg/g				0.02 µg/g			
	併行	日間	作物間	室内	併行	日間	作物間	室内
エチオン	2.61	5.31	0.63	5.95	3.68	3.83	4.36	6.87
エトリムホス	2.20	3.68	1.29	4.48	3.12	2.14	4.40	5.80
クロルピリホス	2.47	3.27	2.30	4.70	3.00	1.96	6.56	7.48
クロルピリホスメチル	2.52	4.70	3.78	6.53	3.21	3.42	6.65	8.14
ダイアジノン	2.58	3.87	1.81	5.00	3.21	1.67	4.39	5.69
パラチオン	2.32	4.18	0.00	4.78	3.30	2.29	2.79	4.89
パラチオンメチル	2.00	7.69	3.93	8.87	2.66	5.23	5.32	7.92
フェニトロチオン	2.36	7.51	4.49	9.07	3.43	4.29	6.74	8.70
フェンチオン	2.71	4.43	9.58	10.90	2.85	5.32	11.93	13.37
プロチオホス	3.23	4.11	3.93	6.54	3.84	2.42	5.55	7.17

RSD% として表示した。

分担課題 (2) 標準添加法における不確かさおよび検出限界の推定に関する研究

A. 研究目的

食品中の農薬等の分析においては、GC/MS や LC/MS のような質量分析計を検出系とした分析法が繁用されている。これらの検出系は選択性に優れており、例えば UV 検出に比較して試料の前処理によるクリーンアップを容易にできる。一方、質量分析による検出においては、試料溶液に残っている食品マトリクスが、分析対象物のイオン化率に大きく影響し、溶媒中の標準品とは異なるピーク強度となることが知られている。この様な系での定量では、標準品を用いた検量線では試料中の真の濃度を求められない。これを防ぎ、正しい分析結果を得るために、同位体内標準を添加する方法がある。同位体内標準は分析対象とほぼ同じ挙動をとることが期待されるので、イオン化率が変化しても正しい定量値が得られる。しかしながら、800 種類ともいわれる分析対象農薬全てに、同位体の内標準を揃えることは困難である。

同位体内標を使わずに、マトリクス等によるイオン化率の変動の影響を避ける方法として、標準添加法がある。標準添加法では、試料に既知量の分析対象物を段階的添加して分析する。測定値を添加量に対してプロットし、最小二乗法により直線を当てはめる。この回帰直線の X 切片が、元の試料中に存在する分析対象物の量となる。

標準添加法による定量では、1 試料の定量に 3-5 測定が必要であること、試料中の分析対象の濃度と添加する量の関係により、精度が変化すること等により、通常のバリデーションで行われるくり返しにより、精度あるいは不確かさを求めることが困難である。また、農薬分析のような残留分析では、検出限界が

重要な分析法の性能であるが、ブランク測定値の SD を元にした検出限界の定義を適用することができないため、標準添加法による分析の検出限界を定めることができない。

林等は検量線 (回帰直線) の信頼区間を、個々の測定濃度における測定値の標準偏差から求める方法を発表している¹⁾。この方法を適用すれば、標準添加法における回帰直線の標準偏差を求められる。標準添加法の最終的な定量値は X 切片の値である。上記の方法でこの濃度での SD を計算すれば、これから標準添加法の不確かさを推定することができる。

本研究の平成 17 年度には、個々の測定濃度における測定値の標準偏差から回帰直線の標準偏差を求める方法を、標準添加法の回帰直線に応用し、不確かさを求める方法を検討した。また、18-19 年度は、実際の農作物試料溶液に、種類の濃度の農薬を添加した試料を分析することにより、標準添加法のシミュレーションを行い、添加濃度と真度の関係について検討した。

B. 研究方法

標準品添加濃度の推定精度への影響の検討
標準溶液を N 個 (濃度は $X_1 \cdots X_N$) を HPLC で測定し、測定値 $Y_1 \cdots Y_N$ が得られたとき、検量線 $Y = aX + b$ のパラメータ a と b は、以下の式から計算される。

$$a = \frac{\sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X}) Y_i}{S_{XX}} \quad (1)$$

$$b = \left(\frac{1}{N} \sum_{i=1}^N Y_i \right) - a\bar{X} \quad (2)$$

この検量線の信頼区間の幅は

$$\tilde{Y}^2 = A_x^2(X - B_x)^2 + C_x^2 \quad (3)$$

で表され、係数 A_x , B_x , C_x はそれぞれ

$$A_x = \tilde{a} \quad (4)$$

$$B_x = -\frac{\text{Cov}(a,b)}{\tilde{a}^2} \quad (5)$$

$$C_x = \tilde{b} \left[1 - \frac{\text{Cov}(a,b)^2}{\tilde{a}^2 \tilde{b}^2} \right]^{1/2} \quad (6)$$

である。 \tilde{a} は検量線の傾き a の SD, \tilde{b} は切片 b の SD, $\text{Cov}(a,b)$ は傾きと切片の共分散である。これらの値は以下の式で表される。

$$\tilde{a}^2 = \frac{1}{S_{xx}^2} \left\{ \sum_{i=1}^N (X_i - \bar{X})^2 \tilde{e}_i^2 \right\} \quad (7)$$

$$\tilde{b}^2 = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{1}{N} - \frac{\bar{X}}{S_{xx}} (X_i - \bar{X}) \right\}^2 \tilde{e}_i^2 \right] \quad (8)$$

$$\text{Cov}(a,b) = \sum_{i=1}^N \left[\left\{ \frac{(X_i - \bar{X})}{NS_{xx}} - \frac{\bar{X}}{S_{xx}^2} (X_i - \bar{X}) \right\} \tilde{e}_i^2 \right] \quad (9)$$

X , Y , N は与えられているので、各測定値 Y_i の標準偏差 e_i が分かれば、検量線の信頼区間を計算することができる。

測定値 Y_i の不確かさ e_i には、HPLC による測定に伴う不確かさと、試験溶液中の分析対象物濃度の不確かさ、つまり前処理による試験溶液中の分析対象物濃度のばらつきが含まれる。

$$e_i^2 = (SD_{prep})^2 + (SD_{meas})^2 \quad (10)$$

・測定の不確かさ

HPLC 測定に伴う不確かさ SD_{meas} は、装置に注入される溶液の量の不確かさと、検出器からのノイズが信号に加わることによる不確かさに分けられる。

$$e_i^2 = (SD_{prep})^2 + (SD_{inj})^2 + (SD_{noise})^2 \quad (11)$$

装置に注入される溶液量の不確かさは、使用している装置の性能から推定できる。通常、注入量の不確かさは RSD% で与えられる。注入に伴う測定値の SD_{inj} は、それぞれの測定値にこの RSD をかけた値となるので、濃度により異なる。

$$SD_{inj} = Y \times RSD_{inj}$$

ノイズによる測定値の不確かさ SD_{noise} は、FUMI 理論を使いベースラインノイズを解析することによって求められる。

・濃度の不確かさ

前処理によって生じる試験溶液中の分析対象物の濃度の不確かさは、添加する標準液の濃度及び量の不確かさと、前処理操作による不確かさの和である。

以上より、測定値 Y_i の不確かさには

- a. 測定器への注入量の変動
- b. ノイズによるピーク面積の変動
- c. 添加する標準液の濃度の変動
- d. 添加する標準液の量の変動
- e. 前処理による濃度の変動

が寄与することが分かる。

a の注入量は HPLC であれば 0.5%以下、GC でも 2%程度である。相対標準偏差(RSD)として一定と考えられ、ピーク面積の SD として表現すると、濃度 X に応じて変化する。

b のノイズによる変動は、濃度によらず一定であるが、影響の程度は濃度に依存する。農薬分析の場合は検出限界に近い濃度を測定することもあり、この変動はピーク面積の 10-20%程度となる可能性がある。

c 及び d は標準品の秤取、溶媒を加えて溶解する際の溶媒量、溶液を添加する量のばらつき等から求められる。天秤、メスフラスコ、ピペット等の不確かさは小さいので、c 及び d の大きさは、大きくても 1%程度と考えられる。

e は操作手順の複雑さによるが、抽出・カラム精製・再溶解等を全て含めて 5-20%程度の影響と考えられる。

不確かさ評価では、最大の寄与原因の 1/3 以下の寄与は無視できるといわれている。従って、目的とする濃度が検出限界より十分に大きい場合には e のみ、検出限界に近い場合には b と e を考慮する必要がある。

上記の計算方法を用いると、色々な条件下における標準添加法の精度が計算可能となる。精度は試料中に存在する分析対象物濃度添加する濃度の関数として表すことができ、精度プロファイルと呼ばれている。添加濃度レベル、レベルの数等の標準添加デザイン、前処理による濃度の変動 (RSD) が、標準添加法の精度プロファイル及び検出限界にどのように影響するかを検討した。

まず、分析対象物の想定濃度を 0.01 ppm 付近とし、

a	0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm
b	0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm
c	0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ppm

を添加する 3 種の濃度の組み合わせにおける精度プロファイルを計算した。

イオン化率がマトリクスの影響を受けていない場合の検量線の傾きを 100 とした。従って 0.01 ppm でのピーク面積は 1 となる。

計算に含めるパラメータは、

1. ノイズによるピーク面積変動
 2. 前処理による試料溶液中濃度の変動
 3. イオン化率の変動
- とした。

定量限界に近い濃度域にあると考え、ノイズによる面積変動の SD は、通常のイオン化率での 0.01 ppm のピーク面積の 1/10、つまり 0.1 とした。イオン化率変動があっても、この値は一定とした。前処理による変動は、5,10,15%の 3 種類を設定した。イオン化率の変動は検量線の傾きの変化として現れるので、傾きが 2 倍の 200 の場合と、1/2 の 50 になった場合を検討した。

標準添加シミュレーションによる添加濃度の真度への影響の検討

マトリクスによりイオン化率が変動すると報告されている農薬を、LC/MS による農薬等の一斉試験法 I の対象となっている農薬から 8 種類 (グループ A)、LC/MS による農薬等の一斉試験法 II から 7 種類 (グループ B)、選択した。選択した農薬を以下に示す。

LC/MS による農薬等の一斉試験法 I 対象農薬

アザメチホス
メトキシフェノジド
イプロバリカルブ
クロマフェノジド
ブタフェナシル
ナプロアニリド
ピラゾリネート

フラチオカルブ

LC/MS による農薬等の一斉試験法Ⅱ対象農薬

チフェンスルフロン-メチル

プロモキシニル

アイオキシニル

ジクロロプロップ

トリフルスルフロン-メチル

アシフルオルフェン

ホサメフェン

これらの農薬について分析条件を検討し、下記の条件を決定した。

分離条件

カラム : C18 内径 2 mm, 長さ 150 mm,

粒径 3 μm

カラム温度 : 40 $^{\circ}\text{C}$

移動相 : A 液 : 5 mmol/L 酢酸アンモニウム水溶液, B 液 : 5mmol/L 酢酸アンモニウムメタノール溶液

注入量 : 5 μL

それぞれの農薬の LC/MS/MS 条件を Table 1 に示す。

ノイズパラメータの解析及びピーク面積測定のためのデータの取り込み間隔は 200 ms とした。各農薬の分析条件に従ってベースラインデータを取り込み、ノイズパラメータを計算した。計算には専用ソフトウェア TOCO を用いた。求めたノイズパラメータと標準品ピークの面積から、それぞれの農薬の検出限界を推定した。各農薬の検出限界を Table 2 に示す。

試料作物としてオレンジと大豆を選択し、それぞれ一斉試験法の試料調製方法に従い抽出溶液を作製した。これに上記農薬を添加した溶液を LC/MS により分析しそれぞれのピーク面積を得た。添加濃度は Table 2 に示した検出限界濃度の、3, 4, 5, 6, 9, 10,

11, 12, 15, 18, 21 倍とした。

Table 3 には、標準添加法シミュレーション実験での添加濃度を示す。濃度は検出限界に対する比として示す。A~C は試料中の濃度を 3 とし、添加レベルの最大値を 3 倍, 5 倍, 7 倍とする場合に相当する。D と E は試料中濃度が 9 で、添加濃度範囲が小さい場合と大きい場合とした。

C 研究結果

標準品添加濃度の推定精度への影響の検討

Fig. 1 は、0.01 ppm の分析対象物を含む試料中に、0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm を添加した際の、添加濃度に対するピーク面積のプロットである。中央の太い線は変動の影響を受けない真の検量線である。添加しない試料から得られるピーク面積は 1 であり、X 切片は分析対象物存在量の 0.01 ppm となる。

実際にはピーク面積のような測定値は、種々の変動の影響を受けて、○のように真の検量線からははずれた値となり、これらの誤差を含んだ値から回帰分析により得られた直線は、真の検量線とは異なっている。検量線測定の実験を多数回行って得られる多数の回帰直線の 95% 信頼区間を、灰色の線で示す。信頼区間の幅は、式(3)で求められる。

実際の分析で重要なのは、Y 軸方向のピーク面積の変動ではなく、定量値である X 切片の変動である。図に示した信頼区間の上側と下側が X 軸と交わる点は、厳密には対称ではないが、Y=0 における信頼区間を検量線の傾きで割って近似することとした。

Fig.1 では、ベースラインノイズによる変動の SD を 1, 前処理による変動の RSD を 10% とした。この条件で、試料中に存在する分析対象物の各濃度での、分析値の RSD を計算し、Fig.2 に示した。分析値の精度は、0.017 ppm 付近で最も小さくなり、これより

も高濃度では RSD が大きくなった。この図から、測定により試料中の分析対象物の濃度が得られたときの RSD が求められるので、それから不確かさを求めることができる。この条件で 0.02 ppm の定量値が得られた場合には、RSD は 19%であるので、不確かさは

$$0.02 \times 0.19 = 0.0038 \text{ ppm,}$$

拡張不確かさは 0.0076 ppm となり、95%区間は、0.0124 ~0.0276 ppm となる。

添加する分析対象物の濃度を

- a 0.005, 0.01, 0.015, 0.02 ppm
- b 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm
- c 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 ppm

としたときの精度プロファイルを Fig.3 に示す。

添加量が全体に大きくなると共に、検出限界及び精度が最も良い濃度が高くなった。最適濃度での RSD はほぼ同じであった。試料中に存在する濃度が添加量上限よりも大きくなると、RSD が急激に大きくなった。例えば、試料中に 0.06 ppm 以上の分析対象物が存在している場合に、a の様な標準添加法を行うと、得られ結果の RSD は 40%以上となる。このような条件で求めた濃度推定値は不確かさがあまりにも大きく、例えば規格への適合の判定に用いることはできない。

標準添加シミュレーションによる添加濃度の真度への影響の検討

Fig.4 にチフェンスルフロン-メチルのクロマトグラムを示す。最低の添加量は検出限界の 3 倍で、かなり低濃度であるため、ピーク部分に大きなノイズが現れている。

Fig.5 にはチフェンスルフロン-メチルの添加濃度とピーク面積を示す。大豆、オレンジのどちらに添加しても、回帰直線の傾きはほぼ同じであった。また、添加濃度に対する

ピーク面積の関係は概ね線形であるが、高濃度側でやや面積が小さくなる傾向が見られ、全体として上に凸になっている。相関係数は大豆が 0.93, オレンジが 0.996 であった。また、切片もゼロではなく、正の値となった。Fig.4 のクロマトグラムに示すように、今回の添加濃度は検出限界に近く、ノイズの影響を受けてピーク面積が変動しやすくなるため、このような結果となったと考えられる。

Fig.6 は、Fig.5 のプロットの上に、Table 3 に示した添加濃度パターンで得られた回帰曲線 5 種類を重ねた。5 濃度から計算した回帰直線の傾きには変動が見られ、高濃度での回帰直線の傾きは小さくなり切片が大きくなる、逆に低濃度での回帰直線の傾きは大きく、切片が小さくなるといった、逆相関の関係が見られる。

添加濃度範囲の小さい A あるいは D では、各点の僅かな面積の変動により、回帰曲線の傾きが変動する。標準添加法では、切片を傾きで割った値が分析値となるため、傾きの変動が分析値の変動に大きく影響することは、容易に想像できる。また、ピーク面積が濃度に対して直線ではなく、全体として高濃度側で傾きが小さくなることから、C、E の添加パターンでは回帰直線の傾きが小さくなり、X 切片が大きくなることから、推定された濃度は、大きな正のバイアスを示す結果となる。

Table 4 及び 5 は A~E の添加濃度パターンのシミュレーションから推定された試料中の農薬濃度と、真値 (A~C では 3, D~E は 9) に対するバイアスを示す。また Fig.7 及び 8 にはバイアスをグラフとして示した。グループ A, B ともに、A の添加パターンでのバイアスが比較的小さく、高濃度の添加を含んだパターンでは大きなバイアスとなる農薬がみられた。これは、チフェンスルフロン-メチル以外の農薬でも、高濃度でピーク

面積と添加濃度の直線関係が失われるパターンが多くみられたためである。とくに、オレンジではこの傾向が顕著であり、大豆に比べて大きなバイアスを示している。これは、オレンジ抽出液を連続して注入した場合、感度の低下が著しい農薬があったことが原因の一つとなっている。

D. 結論

標準添加法で得られる回帰直線の変動範囲を求め、精度プロファイルを得る方法を検討した。本方法により、試料中の分析対象物の濃度と精度の関係（精度プロファイル）が得られると共に、検出限界も求めることができる。

添加濃度範囲は、精度プロファイルに大きく影響し、添加する濃度の範囲が狭いと精度良く定量できる範囲も狭くなる。また、試料中に存在する濃度よりから離れた濃度を添加すると、多すぎる場合も、少なすぎる場合も精度が低下した。

標準添加法により得られた分析結果を検証するための実験系として、LC/MS/MSによる農薬一斉分析法を選択した。

選択した分析系において、それぞれの農薬の検出限界を求め、検出限界に基づいて標準添加法模擬実験の添加量を決定した。実際の農作物として大豆及びオレンジの抽出液を作成し、農薬を添加して標準添加法のシミュレーションを行った。この結果、検出限界近くの低濃度では、値が変動するとともに、濃度とピーク面積の関係、あるいはマトリクスからの影響により大きなバイアスが現れることが明らかとなった。

回収率あるいはイオン化率がマトリクスにより変動しやすい農薬の分析において、標準添加法は強力な方法であるが、標準添加法自体の不確かさの要因もあり、正確な分析の

ためには、適切な添加量、濃度とピーク面積の相関等を考慮することが必要である。

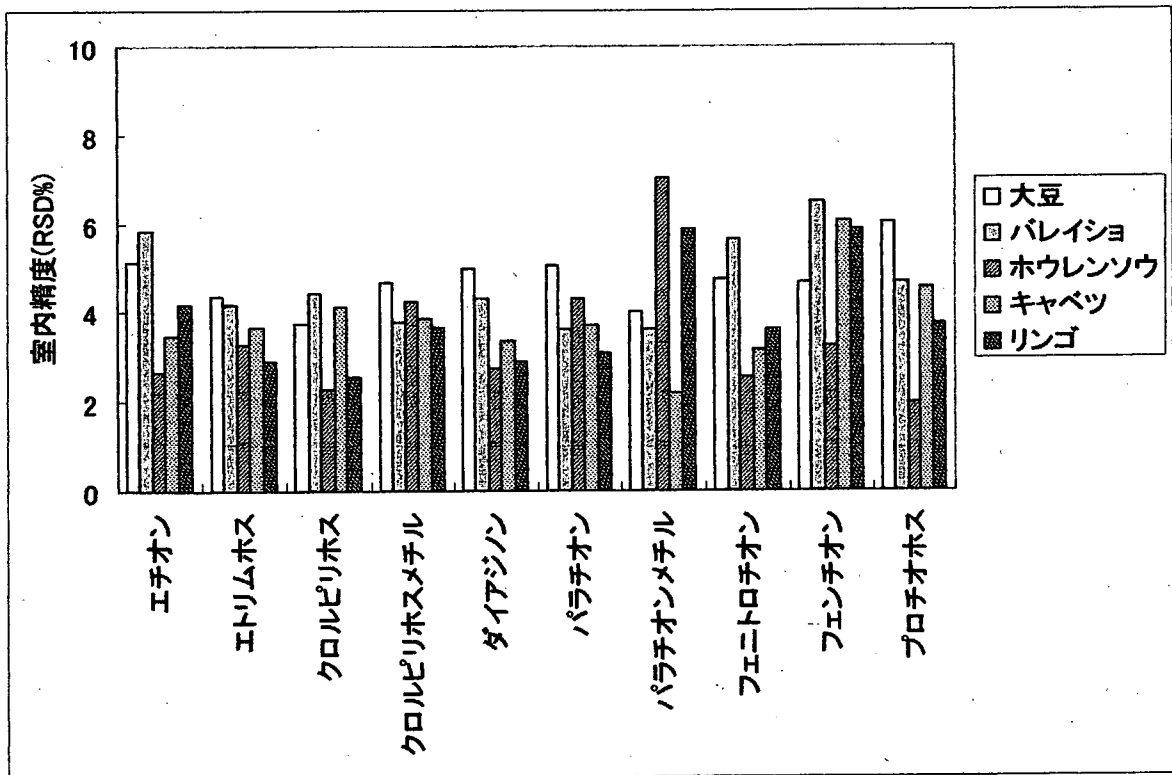
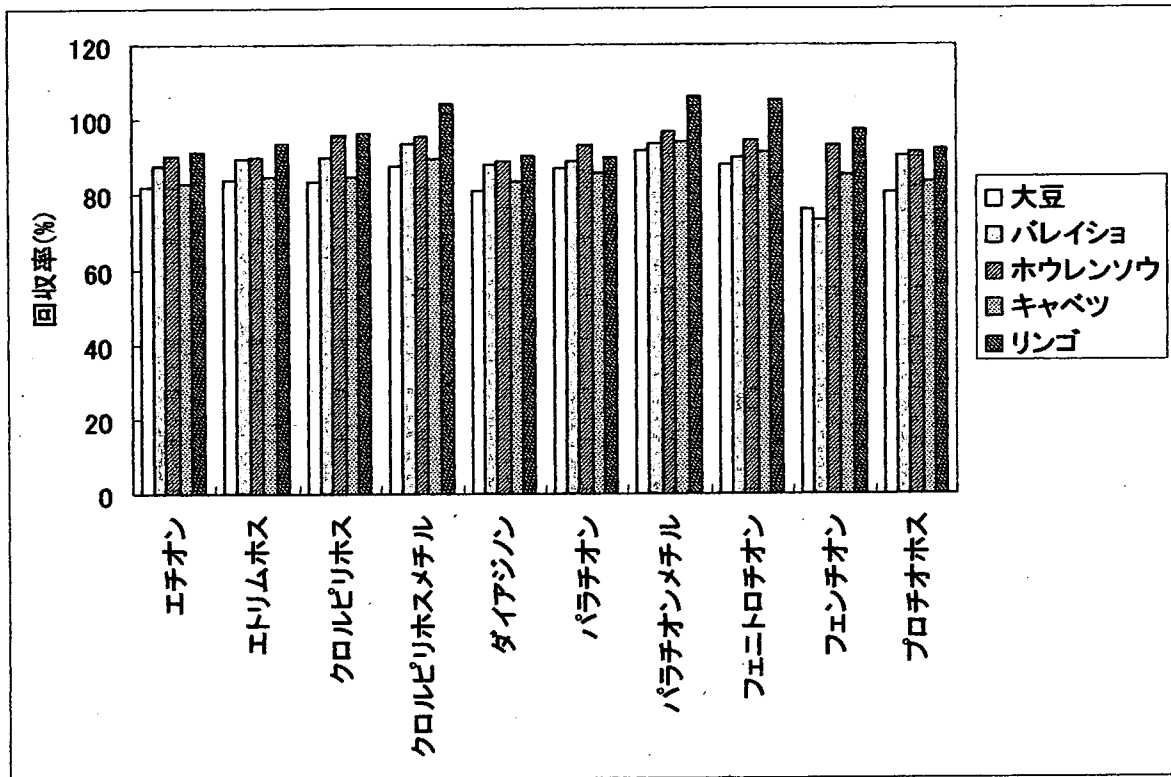


Fig 1 農薬毎の回収率 上 : 0.1 µg/g, 下 : 0.02 µg/g

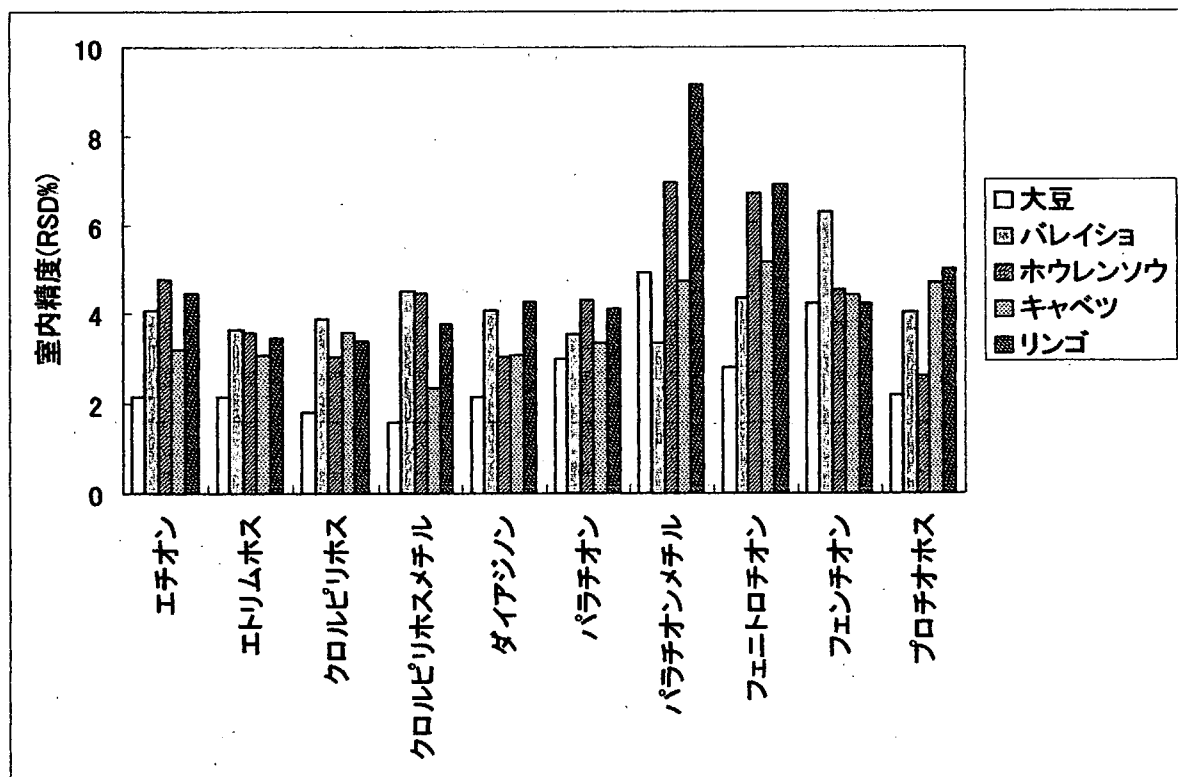
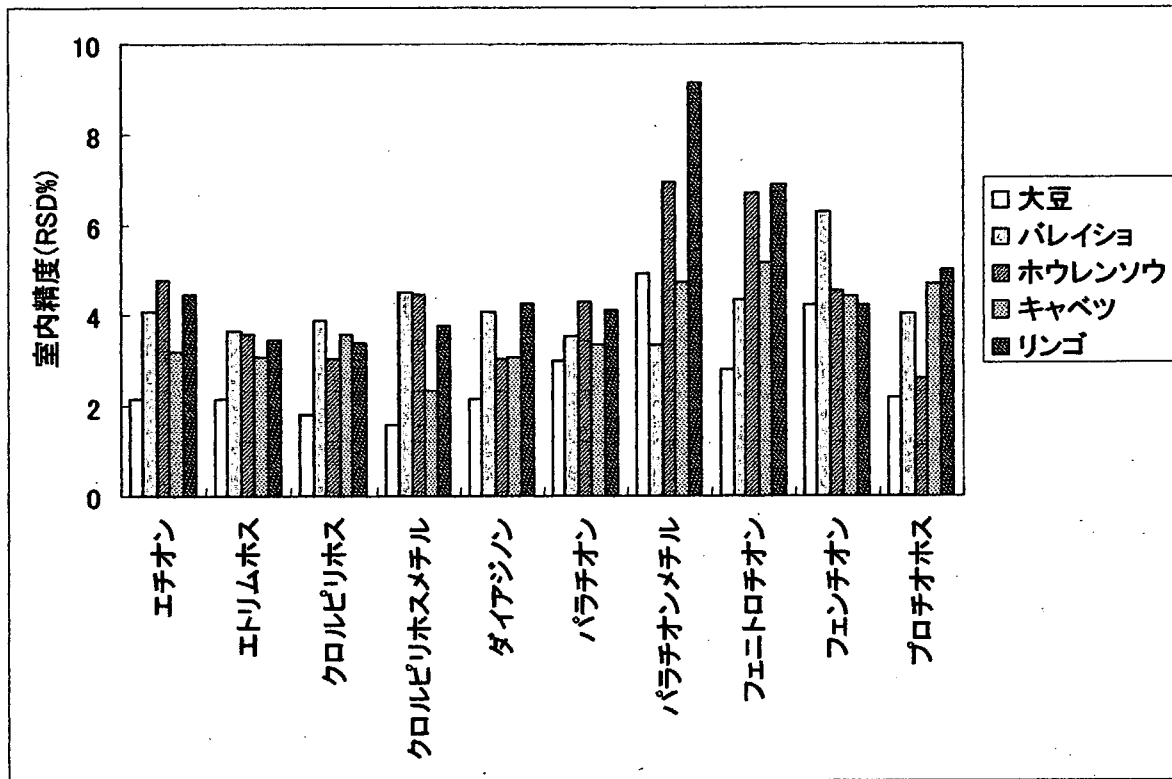


Fig 2 農薬毎の室内精度 上 : 0.1 µg/g, 下 : 0.02 µg/g

Table 1 検討した農薬のMS/MS条件

グループA農薬

		RT	分子量	pos		neg	
			MW	precursor	product	precursor	product
A1	アザメチホス	0.82	324	325	183		
A2	メキシフェノジド	1.12	368	369	149		
A3	イプロバリカルブ	1.15	320	321	119		
A4	クロマフェノジド	1.15	394	395	175		
A5	ブタフェナシル	1.15	474	492	331		
A6	ナプロアニリド	1.19	291	292	171		
A7	ピラゾリネート	1.26	438	439	91	(290	143)
A8	フラチオカルブ	1.32	382	383	252		
A8-2	フラチオカルブ(2)*			383	195		

グループB農薬

		RT	分子量	pos		neg	
			MW	precursor	product	precursor	product
B1	チフェンスルフロン-メチル	0.5	388	388	167		
B2	プロモキシニル	0.57	275			276	81
B3	アイオキシニル	0.73	371			370	127
B4	ジクロルブロッブ	0.86	234			233	161
B5	トリフルスルフロン-メチル	0.92	493	493	264		
B6-1	アシフルオルフェン	1.04	361			360	316
B6-2	アシフルオルフェン(2)*					360	195
B7	ホメサフェン	1.04	438			437	195

*フラチオカルブ及びアシフルオルフェンは、通知の条件では感度が低かったため、(2)の条件に変更した。

Table 2 検討した農薬の検出限界濃度

農薬名	検出限界(ppb)
アザメチホス	0.258
メトキシフェノジド	0.442
イプロバリカルブ	0.14
クロマフェノジド	0.1
ブタフェナシル	0.141
ナプロアニリド	0.376
ピラゾリネート	0.293
フラチオカルブ	0.1
チフェンスルフロン-メチル	1.2
プロモキシニル	1.4
アイオキシニル	0.5
ジクロルプロップ	3.3
トリフルスルフロン-メチル	0.24
アシフルオルフェン	9.3
ホサメフェン	5.5

Table 3 添加濃度のパターン

A	3	4	5	6	9
B	3	6	9	12	15
C	3	9	12	15	21
D	9	10	11	12	15
E	9	12	15	18	21

添加濃度は検出限界濃度に対する比で表示

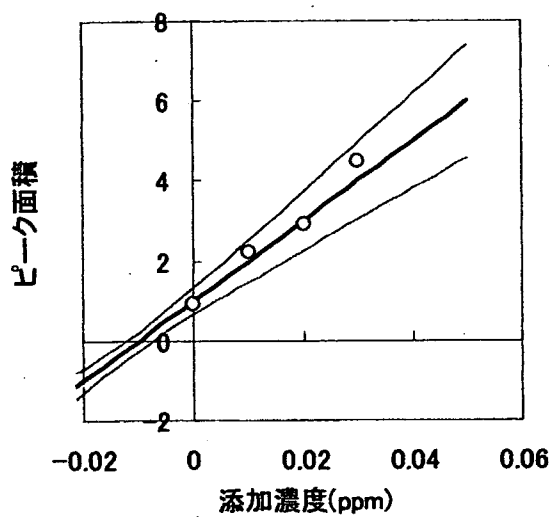


Fig. 1 標準添加法の回帰直線と信頼区間

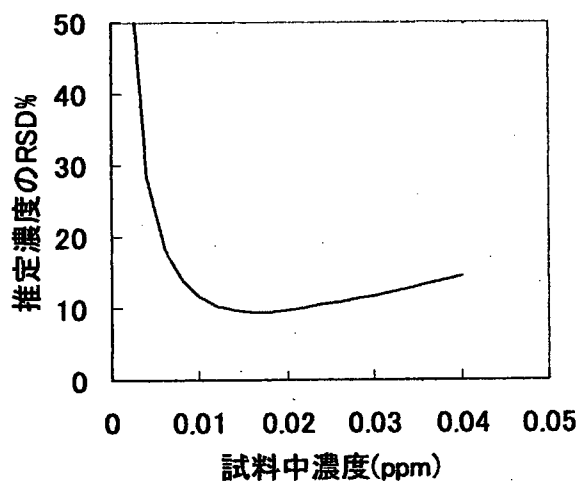


Fig. 2 精度プロファイル

添加量 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 ppm

検量線の傾き 100, ノイズSD 1, 前処理RSD 10% として計算した

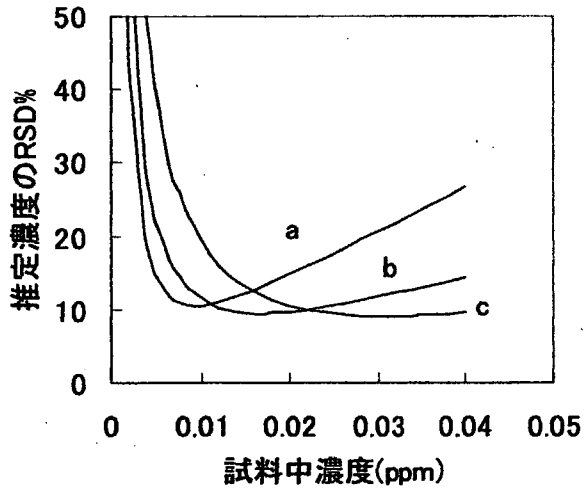


Fig. 3 添加濃度の精度プロファイルへの影響

添加量

a 0.005,0.01,0.015,0.02 ppm;

b 0.01,0.02,0.03,0.04 ppm;

c 0.02,0.04,0.06,0.08 ppm

検量線の傾き 100, ノイズ SD 1, 前処理 RSD

10% として計算した

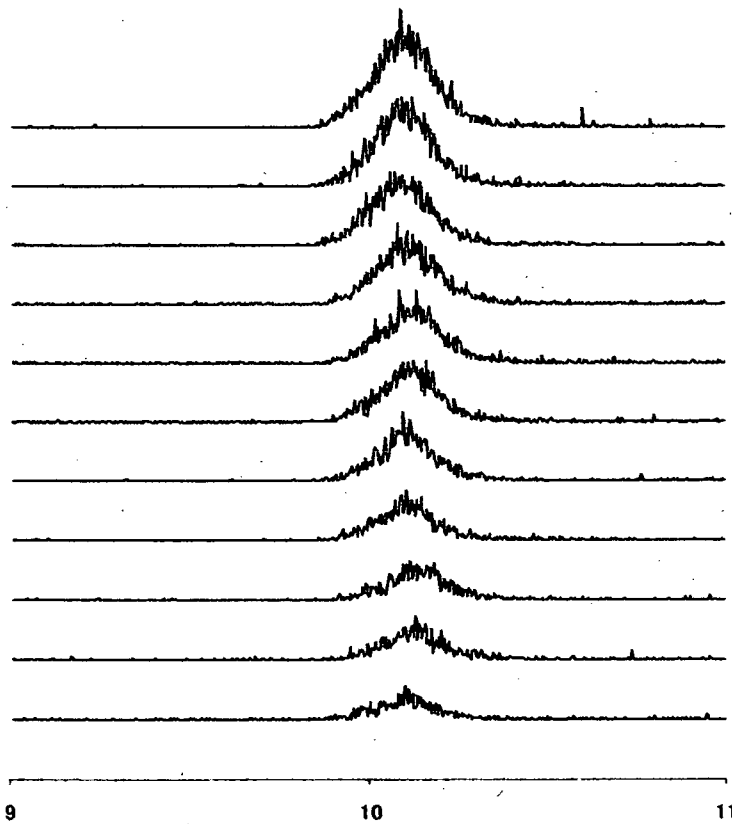


Fig.4 オレンジに添加したチフェンスルフロナーメチルのクロマトグラム

添加量：下から検出下限濃度の3, 4, 5, 6, 9, 10, 11, 12, 15, 18, 21倍

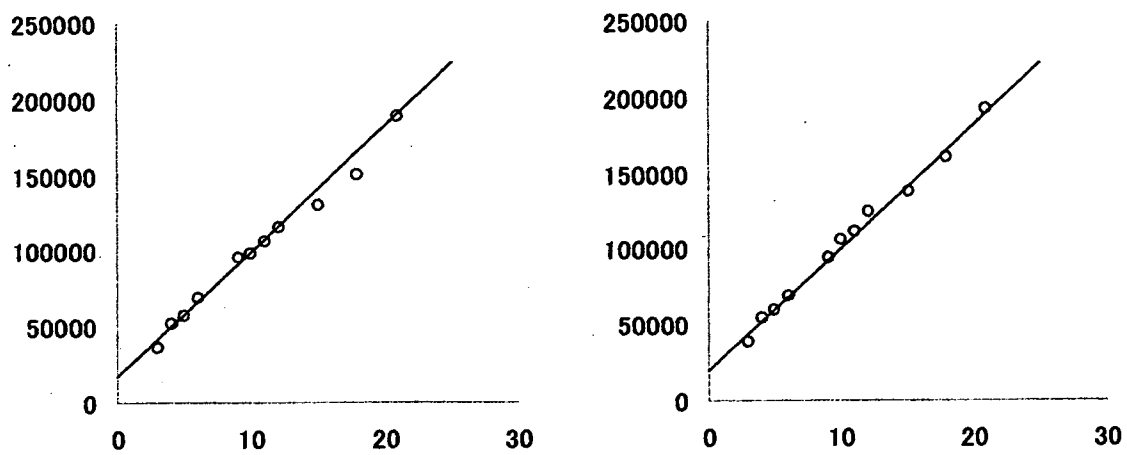


Fig.5 チフェンスフロナーメチルの添加濃度とピーク面積
左 大豆, 右 オレンジ

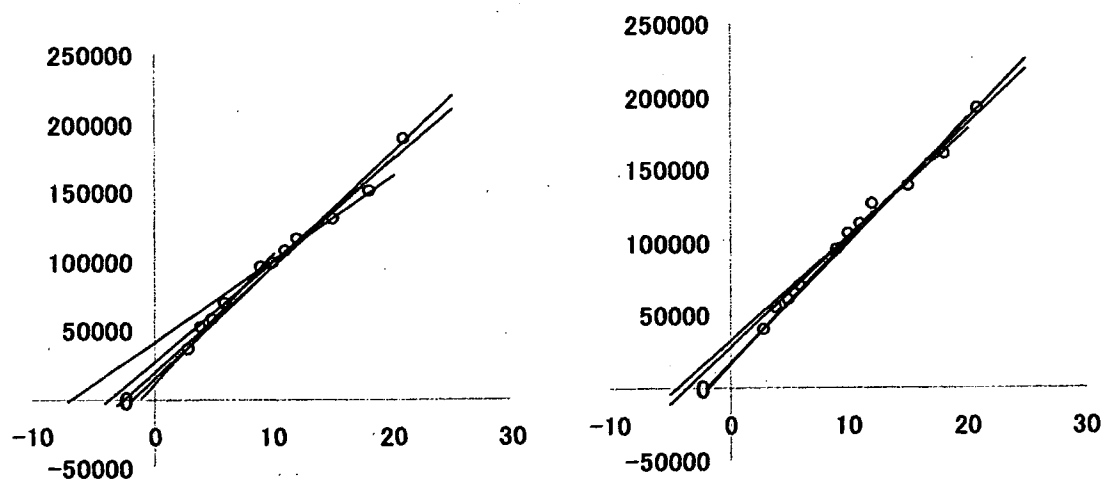


Fig.6 標準添加の回帰直線
左 大豆, 右 オレンジ

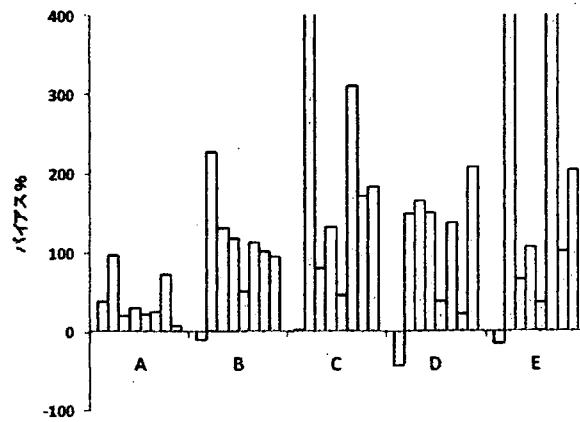
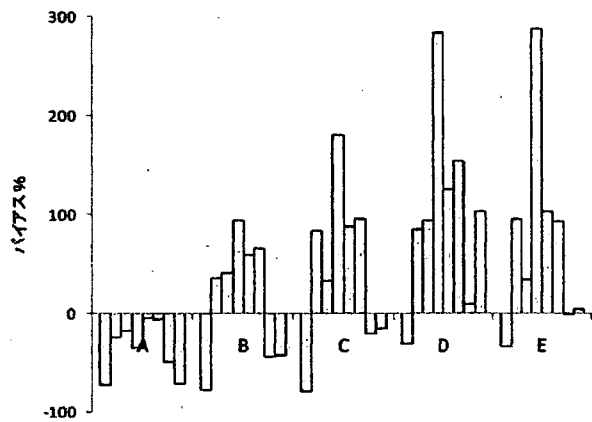


Fig.7 Aグループ農薬シミュレーション結果
左 大豆 右 オレンジ

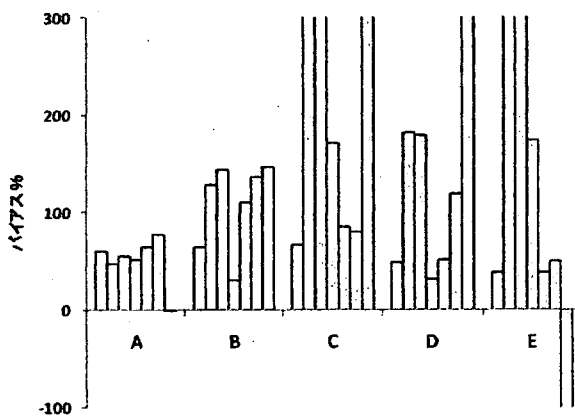
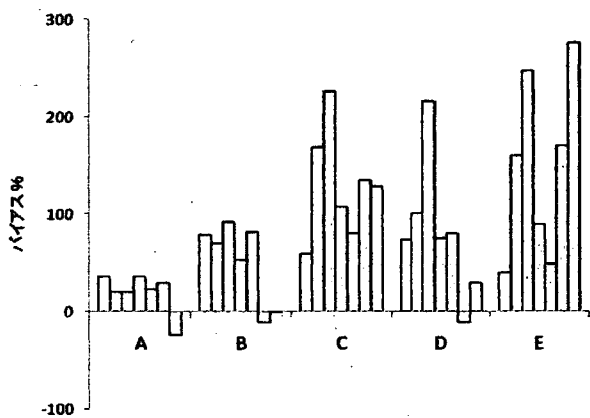


Fig.8 Bグループ農薬シミュレーション結果
左 大豆 右 オレンジ

分担課題 (3) 食品マトリクスに応じた最適前処理技術の検討

A. 研究目的

食品中の農薬分析で議論されてきたように、不確かさの推定は、バリデーションされた試験法で結果を得ることが基本である。微生物試験の場合も、その意味では同じであるが、微生物試験では、そのバリデーションの基準となる標準法（培養法）の設計自体が極めて難しい。さらに、培養法では時間がかかるために、より迅速な非培養法に対する社会的要請が高まっている。

通常、顕微蛍光計測による非培養法では、共存する食品成分等のために、擬陽性や擬陰性のシグナルそのため、微生物細胞のみを非傷害的に分離して、非傷害的に蛍光染色して計数し、その後、培養法で計数すれば、非培養法と培養法の結果が極めて高い確率で一致すると期待される。すなわち培養法と非培養法を同じ基準で議論することができ、上述の要請に応えられるようになる、と考えられる。

しかし、物理的あるいは化学的に異なる様々の成分が含まれる食品マトリクスから、微生物細胞のみを、非傷害的に分離することはそれ程簡単ではない。原理的可能な方法にも限りがある。そこで、国内外の研究技術状況を調査した。既に、簡便で汎用性の高い方法は濾過法であることを、確認していたが、多様な食品の中には濾過の困難なものが少なくない。そこで、難濾過性食品に適用できる方法を開発することが重要と考えた。その候補として超音波分離法 (I) と密度勾配遠心法 (II) に着目した。

B. 研究方法

(I) 超音波分離法

超音波分離法は、スウェーデンのルント大学工学部のトーマス・ローレル(Thomas Laurell) 教授らが開発した方法で、既に、血液試料へ適用され、脂肪と細胞の分離に好成績を収めていること、分離対象の物性に適した専用デバイス設計の自由度があること、などにより、これまで分離困難であった食品群に対しても、それぞれ専用デバイスの開発によって、広く適用できるようになると期待された。そこで、難濾過性食品への適用の一例として、生乳中の脂肪粒と微生物（添加した大腸菌 *Escherichia coli*）を分離する場合について検討した。

超音波分離の原理は次のようである。すなわち幅 300 μm の細い流路（以下分離チャンネル; Separation Channel; SC）を一定流速で試料液を流しつつ、SC の両側から超音波を照射すると、SC 内の流れ方向と垂直に定在波が形成される（図 1 A, B）。試料液中の微粒子（細胞や脂質の微粒子）には、その密度、圧縮率、などに応じて最小振幅の場所（node と称する）へ、あるいは逆に最大振幅の場所へ押しやられる力が働く。標準的な条件では、SC 中央部が最小振幅となる。したがって、SC を通過する間に、SC の中央部あるいは側壁近傍へ分離されることになる（図 1 B）。SC の入口、出口は分岐しており、試料を導入する場合は、中央部、側壁近傍の何れかへ別々に導入することができ、また、出口でも、中央 (a)、側壁近傍(b) のそれぞれの画分を回収できるようになっている。

実験項目は (1) 水溶液に懸濁させた *E. coli* に及ぼす超音波の影響の調査、(2) 分離された分画中の *E. coli* の菌数計数条件の検討、(3) 生乳中の脂質に及ぼす超音波の影響の調査、(4) *E. coli* を添加した生乳での菌体と脂質の分離実験、である。なお、メチレンブルーで染色して菌の挙動を可視化し、菌の分

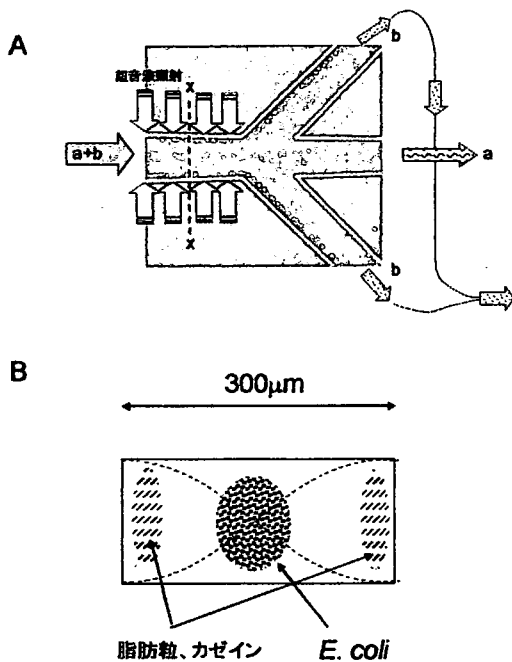


図1. SCでの *E. coli* と脂肪粒の分離. (A) 模式図、(B) SC内の超音波節点と *E. coli* と脂肪粒・カゼインの分離. AのXX断面での想定図.

分離条件の概略を求め、同一条件で染色していない菌を流し、回収後、①ヘマサイトメーターを用いた顕微計数、②二重蛍光染色法による自動顕微計数装置(松下エコシステムズ社のバイオプローラ)、③寒天プレートによるコロニー計数法、で菌計数を行った。

(II) 密度勾配遠心分離法

初めに Ficoll を用いる密度勾配遠心分離法で、生乳に添加した大腸菌の分離を行った。その結果、

① 1% Triton X-100、10 mM EDTA (終濃度) で、12,000 rpm×5 min

② Ficoll (10, 20, 30, 40, 50%) で 25,000×20 min

の条件で、添加大腸菌は Ficoll 30% および 40% に回収されることがわかった。一方、自然混入菌は、Ficoll 20% および 30% に回収されることがわかった。

しかし、Ficoll は粘性が高く、実用的には

様に、密度勾配遠心分離を行った。Percoll 密度勾配を調製した上に、試験菌希釈液 200 μl (2×10^4 cells) を重層し、4°C、5,000 rpm、30 min で遠心後、マイクロピペットで、遠心管上方から 200 μl ずつ回収した。回収した各密度層 100 μl を CFDA で染色した後、バイオプローラ(松下エコシステム)で菌数測定した。また残りの 100 μl を標準寒天培地に播いて 37°C、130 rpm、18 h 培養した後、コロニー計数して生菌数とした。

C. 研究結果

(I) 超音波分離法

水溶液に懸濁させた *E. coli* に及ぼす超音波の影響の調査

超音波強度(具体的には正弦波のピーク電圧)、超音波周波数、SC内流速、試料導入場所(中央か側壁近傍か)、などについて検討し、正弦波 5V_{PP}、2 MHz、SC内流速 30 μm/min、で、菌体が中心部へ多く回収される傾向が認められた(図2)。

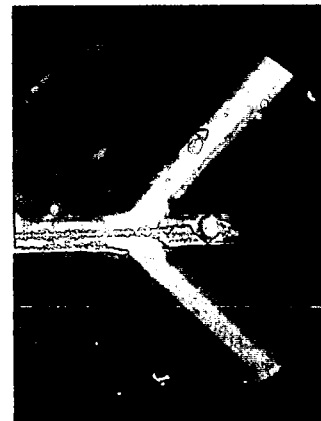


図2. SCでの *E. coli* 分離画像. 中央の白く見える線が *E. coli* の流れ

分離された分画中の *E. coli* の菌計数条件の検討

当初、導入した菌の全量回収を試みた。しかし、SC内を流れる間に、流れ方向に菌体

が拡散し、出口において何 ml 回収すれば全量回収したことになるのか、定量的判断は難しかった。そこで、出口における各画分内の菌数を調べ、その菌数から、中央部から側壁近傍へ、あるいはその逆への移動によって、菌体がどのくらい分離濃縮されるか、について相対的濃度によって分離効率を示すことにした。

生乳中の脂質に及ぼす超音波の影響の調査

生乳を導入して、脂質の分離が可能か調べてみることにした。その結果、脂質は側壁近傍画分へ分離濃縮されることが分かった。しかし、同時に SC 内の側壁に脂肪塊が蓄積してしまうことが明らかとなった。洗浄によって除去できるものの、その後の分離作業に大きな影響を及ぼすと予想された。そこで、脂肪を中央部画分へ分離できるような条件を考案した。すなわち、SC の幅の大きいもの (700 μ m) に変え、node が 2 箇所に行き渡るような超音波 (2MHz 正弦波 6V_{pp}) 条件とした。この条件下で、中央部から生乳試料を導入し、SC 内流速 17.5 μ l/min で分離を試みたところ、脂肪の側壁部への蓄積は認められなくなっ



図3. ダブルノードモードでの分離. *E. coli* を添加した生乳を中央から導入した。白く見える2本の線は *E. coli* の流れ。脂肪は大部分が中央部に残ったと推定され、側壁部への蓄積は認められなくなった。

た (図3)。

E. coli を添加した生乳での菌体と脂質の分離実験

以上の結果を踏まえ、10 倍希釈生乳に *E. coli* 10⁸ cell/ml を添加し、これを、SC 中央部から導入した。その結果、脂肪は中央の node に、*E. coli* は両脇の node に分離されることが分かった。前者は中央部画分として、後者は側壁近傍画分として回収された。各画分の菌数から、相対的分離効率は、100% × (側壁近傍画分内の菌数) / [(側壁近傍画分内の菌数) + (中央部画分内の菌数)] = 約 60% であった。すなわち、中央部から SC へ導入した *E. coli* の 60% が側壁近傍画分内に回収されることが分かった。この結果に基づけば、今回用いた SC を高々 3 段組み合わせるだけで 90% (0.6+0.4×0.6+0.4×0.4×0.6) の回収率が得られることになる。すなわち、実用的見地からも十分適用できる分離法であるとの結論を得ることができた。

(II) 密度勾配遠心分離法

Percoll 密度各画分の採取性能評価基準

Percoll 密度勾配遠心分離後に、各密度層を乱すことなく、各画分を採取するためのデバイス設計が行った。その性能評価に際して、予め、基準とすべき性能を明らかにしておく必要があった。図4に示すように、上層から慎重にマニュアル操作で採取して、全体の回収率、及び各画分への分配率を調査した。3 人の実験者が実施した結果を表1に示す。

E. coli の PB 懸濁液 300-400 cfu/100 μ l を試料として、分離後、各層 200 μ l ずつ採取し、培養法でコロニー計数した。一方、遠心分離前の試料についても培養法でコロニー計数し、添加菌数とした。表1に示すように、添

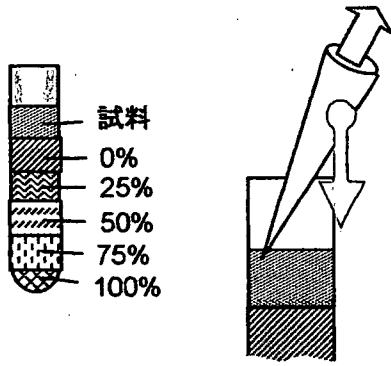


図4. 上層からの採取

加回収率は3人とも $100 \pm 5\%$ 以内であった。即ち、100%の回収率を基準にすることが妥当であると判断された。また、この場合、3人の実験者のデータを区別せずに考えても差し支えないと判断されたので、各層への分配率は、3人分計10試料についての平均、および標準偏差を求めた。その結果、82%の菌が Percoll75%層に回収されることがわかった。そこで、デバイスの性能としては、80%以上の菌が75%層に回収されたら合格と判断することとした。

採取デバイスの性能評価

遠心管の上層から採取する方法の場合、採取管先端位置の制御が難しい。そこで、上記のマニュアル操作の場合と異なり、採取管を遠心管に底まで挿入し、下層から順に採取する設計とした。しかし、1本の採取管で $200\mu\text{l} \times 6$ 層を連続して採取しても、その後、それを分けることが難しかった。次に、6本の採取管を用意し、1本挿入して $200\mu\text{l}$ 採取する

操作を、採取管を交換しながら6回繰り返した。しかし、操作の過程で層が乱れ、良好な回収性能は得られなかった。

そこで、採取管としてシリンジの針を利用し、これを6本束ねて最初から挿入しておき、順次、 200ml ずつ吸引して採取するようにした(図5)。その結果、表2に示すように、97%の添加回収率、86%の菌が Percoll75%層に回収、という性能が得られた。

以上により、採取デバイスの仕様で最も重要な項目である採取管の設計を決定した。

マイクロフロー制御プレートの基本設計

図5に示された5本のシリンジを順次操作することによって、所期の性能を得ることができたので、この操作を自動化するためのマイクロフロー制御プレートを設計した。この場合、採取した $6 \times 200\mu\text{l}$ を1枚のバイオフローラ専用メンブレンフィルター上に、スポット状に滴下するようにした。

図6に試作したプレートを示す。本プレー

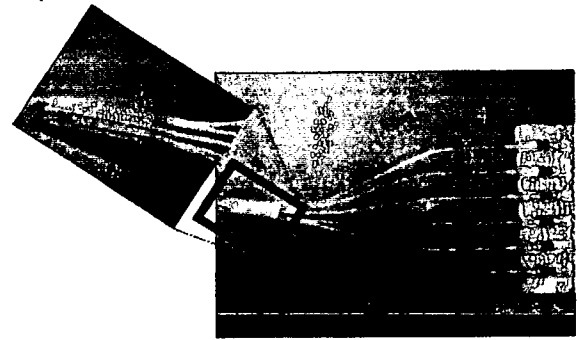


図5. 採取管アセンブリー

表2. 採取デバイスによる添加回収成績

試料No	検出菌数 (cfu/100 μl)					回収菌数 合計 (cfu /100 μl)	添加菌数 (cfu /100 μl)	添加回収 率 (%)	添加回収 率の平均 (%)
	Percoll 密度								
	0%層	25%層	50%層	75%層	100%層				
1	0	7	47	357	6	417	445	93.7	96.6
2	0	8	42	393	8	451		101.3	
3	0	9	38	387	5	439		98.7	
4	0	3	48	345	17	413		92.8	
平均	0	6.75	43.75	370.5	9	430			
分布率 (%)	0	1.6	10.1	86.2	2.1	100			